



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C07K 7/64, A61K 38/13</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/46239</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 10 août 2000 (10.08.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/IB00/00133 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 7 février 2000 (07.02.00) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 220/99 5 février 1999 (05.02.99) CH <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> DEBIO-PHARM S.A. [CH/CH]; 17, rue des Terreaux, CH-1000 Lausanne 9 (CH). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> MUTTER, Manfred [DE/CH]; Chemin de la Venoge 9, CH-1028 Préverenges (CH); WENGER, Roland, M. [CH/CH]; Grenzacherweg 45, CH-4125 Riehen (CH); GUICHOU, Jean-François [FR/CH]; Université de Lausanne, Institut de Chimie Organique, Bâtiment de Chimie, CH-1015 Lausanne (CH). KELLER, Michael [CH/GB]; c/o A. Miller, Imperial College, Technology and Medicine, Dept. of Chemistry, London SW9 21Y (GB); RUCKLE, Thomas [DE/CH]; Université de Lausanne, Institut de Chimie Organique BCH, CH-1015 Lausanne (CH); WOEHR, Torsten [DE/CH]; Roeschibachstrasse 70, CH-8037 Zürich (CH).	<b>(74) Représentant commun:</b> DEBIOPHARM S.A.; Currat Vanessa, 17, rue des Terreaux, CH-1000 Lausanne 9 (CH). <b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
<b>(54) Title:</b> CYCLOSPORIN DERIVATIVES AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF SAID DERIVATIVES <b>(54) Titre:</b> DERIVES DE CYCLOSPORINE ET PROCEDE DE PREPARATION DESDITS DERIVES <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to cyclosporin derivatives, whereby the peptide chain thereof comprises at least one pseudo-proline type non-natural amino acid radical. The invention also relates to a method for the production of said derivatives.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne des dérivés de cyclosporine dont l'enchaînement peptidique comprend au moins un résidu d'acide aminé non naturel de type pseudo-proline ainsi qu'un procédé de préparation desdits dérivés.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Dérivés de cyclosporine et  
procédé de préparation desdits dérivés

La présente invention concerne des dérivés de cyclosporine, la séquence  
5 peptidique desdits dérivés comprenant au moins un acide aminé non  
naturel de type pseudo-proline. Elle concerne également un procédé de  
préparation desdits dérivés.

Les cyclosporines constituent une famille de métabolites secondaires  
10 obtenus par fermentation. Ces substances possèdent des propriétés  
biologiques remarquables. Parmi celles-ci, on peut citer  
l'immunosuppression, l'induction de la prolifération des nerfs dans les  
maladies neuro-dégénératives ou encore l'arrêt de la réplication du virus  
VIH-1. A ce jour, une trentaine de cyclosporines ont été isolées de source  
15 naturelle. La plus connue, par son utilisation lors de transplantation  
d'organe, est la cyclosporine A (CsA). Par la suite, il a été trouvé que cette  
même cyclosporine A pouvait ouvrir de nouvelles voies dans le traitement  
du SIDA en inhibant l'activation des cellules CD4<sup>+</sup>.

20 Les cyclosporines sont constituées d'une séquence peptidique cyclique  
complexe de onze acides aminés, certains d'entre eux étant des acides  
aminés non-naturels fréquemment méthylés sur l'azote. Ces substances  
possèdent un fort caractère hydrophobe qui rend compliqué leur  
administration au sein d'un milieu physiologique.

25 A ce jour, il est toujours nécessaire d'entreprendre des modifications de  
structure de façon à améliorer l'activité biologique et/ou les propriétés  
physico-chimiques des cyclosporines existantes, qu'elles soient d'origine  
naturelle ou synthétique.

30 A cet effet, l'un des buts de la présente invention est de mettre à  
disposition des dérivés de cyclosporine d'origine naturelle ou synthétique,

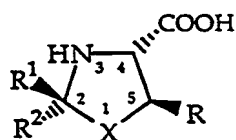
dérivés dont la spécificité pharmacologique a été améliorée, de préférence en faveur de l'inhibition de l'activation des cellules CD4<sup>+</sup> afin d'arrêter la réplication du virus VIH-1.

- 5 Un autre des buts de la présente invention est de mettre à disposition des dérivés de cyclosporine d'origine naturelle ou synthétique, dérivés dont les propriétés physiques ont été modifiées de façon à leur conférer un certain caractère hydrophile afin d'accroître leur solubilisation dans un milieu physiologique et de faciliter ainsi leur administration.

10

Ainsi, la présente invention a pour objet des dérivés de cyclosporine d'origine naturelle ou non, l'enchaînement peptidique desdits dérivés comprenant au moins un résidu d'acide aminé non naturel de formule générale I suivante:

15



(I)

20

dans laquelle,

X représente un oxygène ou un soufre;

R représente un hydrogène ou un alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone,

25 de préférence un méthyle;

R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent, indépendamment l'un de l'autre, un hydrogène, un alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, linéaire ou ramifié, substitué ou non, un alkylène ayant de 1 à 6 atomes de carbone, un aryle non substitué, tel que le phényl, un aryle substitué, tel que le p-carbométhoxy-phényl ou  
30 le p-méthoxy-phényl, un hétéro-aryle substitué ou non.

- R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> peuvent également représenter un résidu d'un polymère hydrosoluble relié éventuellement à un groupe d'espacement ou "spacer". Des exemples appropriés d'un tel polymère incluent des oxydes de polyalkylène (PAO) tels les polyéthylène glycols, des alcools
- 5 polyvinyliques, des polymères à base de carbohydrate. De préférence, le polymère hydrosoluble est un oxyde de polyalkylène tel qu'un polyéthylène glycol. Le groupe d'espacement peut être un alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, un aryle, tel que le phényle, un hétéro-aryle, chacun portant un groupe fonctionnel permettant l'ancrage du polymère.
- 10 Lorsque le polymère est un polyéthylène glycol, alors le groupe d'espacement préféré est le p-carboxy-phénylène.

- Le nom générique de "pseudo-proline" a été donné dans la présente demande à l'acide aminé non naturel de formule générale I et les
- 15 abréviations Ser( $\Psi^{R1,R2}$ pro), Thr( $\Psi^{R1,R2}$ pro) ou Cys( $\Psi^{R1,R2}$ pro) indiquent que, dans la formule générale I, les symboles (X, R) représentent respectivement (O, H), (O, Me) et (S, H) et que l'acide aminé dérive respectivement de la serine, de la thréonine et de la cystéine.
- 20 De préférence, les dérivés de cyclosporine de la présente invention dérivent de cyclosporines, naturelles ou synthétiques, dont l'enchaînement peptidique contient au moins l'un des acides aminés suivants, sous la configuration d ou l: sérine, thréonine ou cystéine. Dans la séquence peptidique des dérivés de cyclosporine de la présente invention, au moins
- 25 l'un quelconque des acides aminés sérine, thréonine ou cystéine, sous la configuration d ou l, des cyclosporines de référence a été remplacé par l'acide aminé non naturel de formule générale I.

- Au vu de la complexité de l'enchaînement peptidique des cyclosporines,
- 30 toute modification chimique de leurs structures s'avère rapidement compliquée. Une synthèse totale se trouve alors inappropriée.

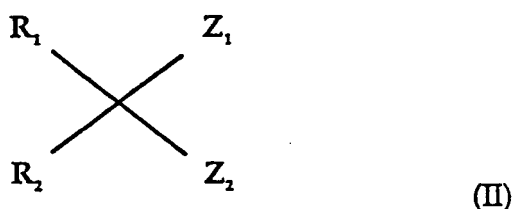
A cet effet, un autre des buts de la présente invention est alors de mettre à disposition un procédé de préparation de ces dérivés de cyclosporine qui soit le plus simple possible en mettant en œuvre des produits, cyclosporines et réactifs, facilement accessibles.

5

Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation des dérivés de cyclosporine dont l'enchaînement peptidique comprend au moins l'un des acides aminés sérine, thréonine ou cystéine par N,O-acétalisation d'au moins un des trois acides aminés précédents en

10 mettant en contact la cyclosporine avec un composé de formule II suivante:

15



dans laquelle

$Z_1$  et  $Z_2$  représentent, indépendamment l'un de l'autre, un halogène, un

20 hydroxy, un alkoxy, un thiol; ou bien

$Z_1$  et  $Z_2$  représentent ensemble, un oxygène d'un carbonyle ou un soufre d'une thione; et

$R_1$  et  $R_2$  ayant la même définition que donnée précédemment.

25 De préférence, le composé de formule II est un acétal ou un thio-acétal.

Les propriétés, les avantages des dérivés de cyclosporine de la présente invention, ainsi que la manière de mettre en œuvre le procédé de préparation de ces dérivés apparaîtront avec les exemples de réalisations

30 présentés ci-après et à l'aide du dessin dans lequel

- la Fig. 1 représente le schéma de synthèse d'un dérivé de cyclosporine;

- la Fig. 2 représente le schéma de synthèse d'un intermédiaire de la préparation du dérivé de la Fig. 1;
- 5 - la Fig. 3 représente les enregistrements de chromatogrammes HPLC au cours du temps d'un essai d'hydrolyse d'un dérivé de cyclosporine;
- la Fig. 4 est une courbe montrant l'évolution au cours du temps de la concentration des produits du même essai d'hydrolyse; et
- 10 - la Fig 5 représente une courbe de cinétique d'inhibition de l'activité cis/trans isomérase de la cyclophiline A du thymus de veau par un dérivé de cyclosporine.
- 15 Trois cyclosporines ont servi de référence pour préparer les dérivés selon l'invention. Deux de ces cyclosporines sont d'origine naturelle. Ce sont la cyclosporine A (CsA) et la cyclosporine C (CsC). La troisième cyclosporine, à savoir la [D-Ser<sup>8</sup>]cyclosporine A, est obtenue par fermentation en incorporant l'acide aminé D-sérine selon la procédure
- 20 décrite par Traber et al. dans *The Journal of Antibiotics*, 1989.

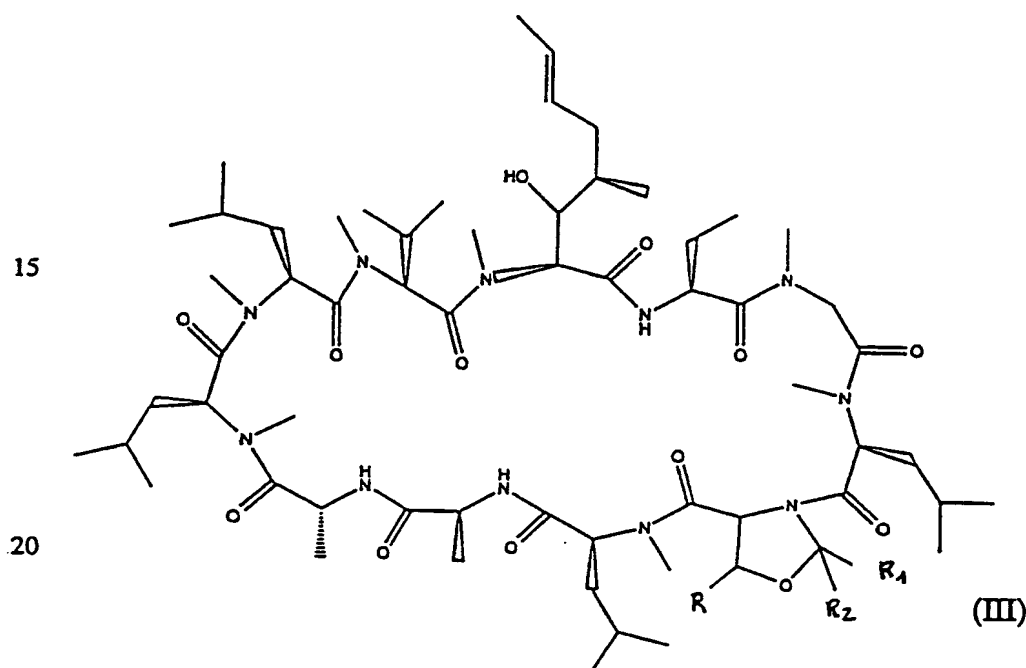
Deux séries d'expériences ont été réalisées selon la nature des dérivés de cyclosporine préparés. La première série d'expériences a été orientée vers la modification des propriétés physiques des cyclosporines, leur conférant  
25 en particulier un caractère hydrophile. La deuxième série a été orientée vers l'amélioration de leurs propriétés biologiques.

A ce propos et selon des études de structure-activité bien établies, on sait que la partie peptidique continue de la cyclosporine A constituée par les  
30 acides aminés situés en position 10 à 11, 1 à 3 (système de numérotation prenant pour position 1 l'acide aminé MeBmt) se lie à la cyclophiline (CyP), protéine ayant une activité peptidylprolyl cis-trans isomérase. La

partie peptidique libre se lie ensuite à la calcineurine (Cn) et le complexe ainsi formé [(CsA-CyP)-Cn] est responsable de l'immunosuppression en inhibant la transcription des gènes essentiels des cytokines. La cyclosporine C se différencie, en ce qui concerne sa structure, de la cyclosporine A par l'acide aminé en position 2, à savoir Ser au lieu de Abu. En revanche, son mode d'action est similaire.

1. Préparation des dérivés de la cyclosporine A, à savoir [5-L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$  pro)]CsA de formule générale III suivante:

10



25 Dans les dérivés de la cyclosporine A de formule générale III, la pseudo-proline L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$  pro) occupe la position 5, se substituant ainsi à la valine de la cyclosporine A.

Pour se faire, le cycle de la cyclosporine A est ouvert par clivage de la liaison peptidique 4-5. La liaison peptidique 7-8 est à son tour clivée. Après des étapes de protection et d'activation, le dipeptide Fmoc-

30



NMeLeu-L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$  pro)-OH, préparé préalablement, est lié à l'acide aminé Ala en position 7, puis le cycle peptidique est refermé, conduisant ainsi aux dérivés [5-L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$  pro)]CsA de la cyclosporine A.

- 5 Les dérivés de formule IIIa et IIIb ont été préparé en faisant réagir le dipeptide Fmoc-NMeLeu-L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$  pro)-OH approprié.

Dérivé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
IIIa	H	MeO-PEG 750-NHCO-phényl-
IIIb	Me	Me

- Le schéma de synthèse du dérivé IIIa, ainsi que celui de l'un de ses intermédiaires de synthèse, le dipeptide Fmoc-NMeLeu-L-Thr( $\Psi^{MeO-PEG 750-NHCO-phényl-, H}$  pro)-OH, sont présentés en détail aux figures 1 et 2. Il apparaît qu'un tel procédé mettant en jeu l'ouverture de la cyclosporine A, insertion d'un peptide contenant la pseudo-proline appropriée puis fermeture du cycle, s'il conduit bien à l'obtention des dérivées de la présente invention, ne peut pas, du fait de sa complexité, permettre la préparation d'un grand nombre de dérivés et ceci à grande échelle.
- 10
- 15

- Nous présentons ci-après un mode de réalisation du procédé de préparation de la présente invention de dérivés de cyclosporine, en utilisant, en tant que cyclosporine de départ, des cyclosporines dont l'enchainement peptidique comprend au moins l'un des acides aminés sérine, thréonine ou cystéine.
- 20

- 25 En une seule étape mettant en jeu une réaction de N,O-acétalisation d'au moins un des trois acides aminés précédents à l'aide d'un composé

approprié de formule II précédente, on obtient un dérivé de cyclosporine dans lequel, la pseudo-proline s'est substituée à l'un des acides aminés sérine, thréonine ou cystéine de la cyclosporine de départ.

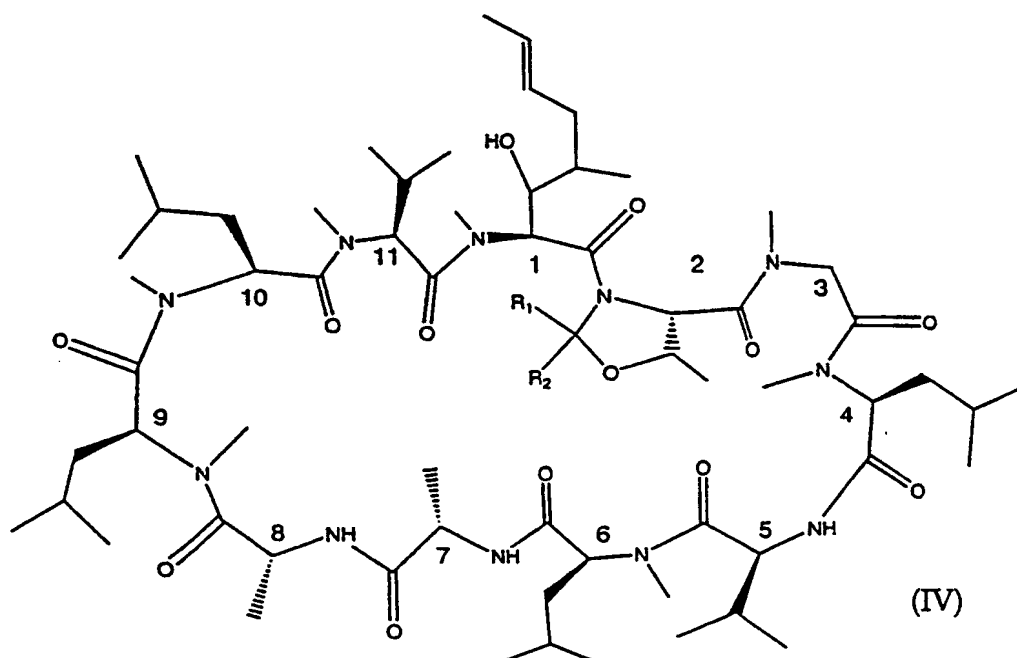
5

2. Préparation des dérivés L-Thr( $\Psi^{R_1, R_2}$ pro)]CsC de la cyclosporine C de formule générale IV suivante:

10

15

20



Les dérivés IVa à IVh ont été préparés selon la procédure générale suivante.

25

Un mélange comprenant de la cyclosporine C (CsC) anhydre (50 mg, 41  $\mu$ Mol), du diméthylacétal  $R_1R_2C(OMe)_2$  (205  $\mu$ Mol, 5 eq) et le sel de pyridine de l'acide p-toluène sulfonique (4.0 mg, 0.4 eq, PPTS) dans du toluène anhydre (4ml) est porté au reflux. Une fois la réaction terminée, la phase organique est lavée par  $Na_2CO_3$  (10%, 2x5 ml) et de l'eau (2x5 ml) et est séchée sur du sulfate de magnésium. La phase organique est concentrée sous pression réduite pour donner une huile. Le produit brut

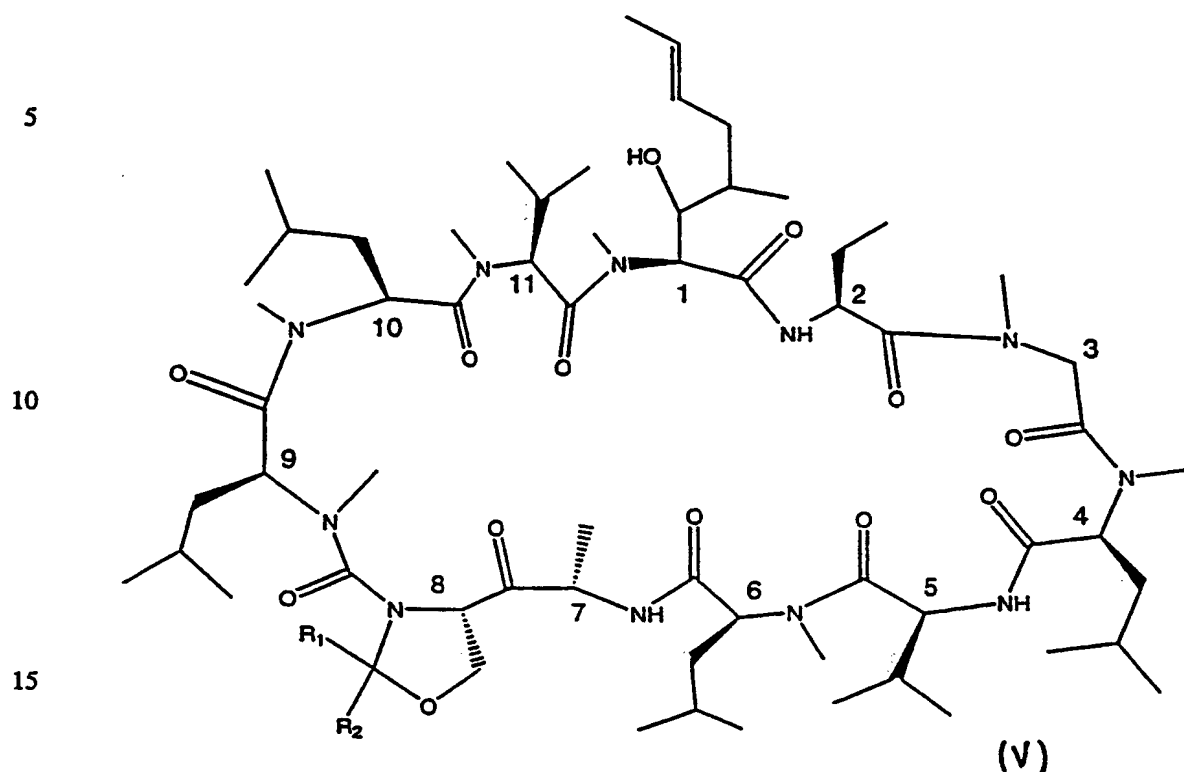
30

est dissous dans 2 ml d'un mélange acétonitrile/eau (1:1/v/v) et est purifié par HPLC en phase inverse ( $C_{18}$ , 60-100% B, 40 min). La lyophilisation conduit à l'obtention d'une poudre blanche du dérivé de cyclosporine C.

5

Dérivé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Temps de réaction (min)	Rdt (%)	Masse (calc.) trouvé m/z
IVa	H	Ph-	45	74	(1306,7) 1306,7
IVb	H	Ph-Ph-	30	89	(1382,8) 1383,8
IVc	H	CH <sub>2</sub> =CH-	60	75	(1256,7) 1257,7
IVd	H	<i>p</i> -CO <sub>2</sub> Me-Ph-	120	55	(1364,7) 1364,7
IVe	H	<i>p</i> -OMe-Ph-	60	90	(1336,2) 1337,2
IVf	H	<i>p</i> -AlOOc-Ph-	50	95	(1390,7) 1391
IVg	H	<i>p</i> -HOOC-PhCH(OMe) <sub>2</sub>	50'	75	(1350,7) 1351
IVh	H	PEG <sup>850</sup> -CH-	240	20	(≈ 1851)≈1851*

3. Préparation des dérivés D-Ser<sup>8</sup>(Ψ<sup>R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub></sup>pro)]CsA de la  
D-Ser<sup>8</sup>-cyclosporine A de formule générale V suivante:



Les dérivés Va à Ve ont été préparés selon la procédure générale suivante.

- 20 Un mélange contenant de la cyclosporine D-Ser<sup>8</sup>-CsA (séchée) (1 éq.), du diméthylacétal R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (10 éq.), du PPTS (pyridinium de l'acide para-toluène sulfonique) (0,4 éq.) et du DMSO anhydre (0,016 M) est chauffé à 100°. Le milieu réactionnel est versé dans 150 ml de AcOEt. La phase organique est lavée successivement avec une solution de NaHCO<sub>3</sub>,  
25 saturée (3 fois) et une solution de NaCl saturée (1 fois), puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Acétone/Hexane 4/6), pour donner une poudre blanche.

Dérivé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Temps de réaction	Rdt en %	Rf (Acétone/Hexane) (4/6)	HPLC en minute	Masse ESI-MS
Va	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3 h	58	0,25	17,98	1244/1276 /1293
Vb	-CH <sub>2</sub> OAc	H	30 h	74	0,32	18,65	1334/1351
Vc	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-Fmoc	H	2 h	70	0,25	17,96	1509/1526
Vd	-Ph	H	3 h	72	0,50	19,16	1306/1323 /1328
Ve	-p-Ph-CH <sub>2</sub> -NH-Aloc	H	20 mn	67	0,54	19,42	1419/1436

#### 4. Propriétés physiques des dérivés de cyclosporine de la présente invention.

##### 4.1. Obtention de prémédicaments

Il a été trouvé, de manière surprenante, que l'introduction d'une pseudo-proline au sein de l'enchaînement d'une cyclosporine permettait d'obtenir un prémédicament ou "prodrug" de cette même cyclosporine.

En effet, la stabilité chimique des dérivés de la présente invention face, en particulier, à des conditions d'hydrolyse acide, a été étudiée en fonction de la nature des groupes portés en position para de noyaux phényle constituant les substituant R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub>. Des groupes électro-attracteur stabilisent le cycle oxazolidine de la pseudo-proline. En revanche, des groupes électrodonneurs tel que le groupe méthoxy rendent la pseudo-proline très sensible aux environnements acide et, par réaction réversible,

le cycle oxazolidine s'ouvre, libérant ainsi la sérine ou la thréonine de la cyclosporine de départ.

Par exemple, le dérivé IVd, obtenu à partir de la cyclosporine C, a été  
5 placé dans des conditions physiologiques telles que celles trouvées dans l'appareil digestif (pH 1, THF/HCl). Comme le montre les figures 3 et 4, en 300 heures, la cyclosporine a été entièrement reconstituée.

#### 4.2. Obtention de dérivés hydrophiles

10

L'accrochage d'un polymère hautement hydrosoluble comme peut l'être le polyéthylène glycol dans les dérivés IIIb et IVh a supprimé le caractère hydrophobe des cyclosporines de départ, respectivement les cyclosporines A et C.

15

5. Activités biologiques des dérivés de cyclosporine de la présente invention, effet inhibiteur vis-à-vis de la cyclophiline A du thymus de veau.

20 Le test de binding décrit par Fisher et al. dans *Biomed. Biochim. Acta*, 1984, pour les cis/trans isomérases a été appliqué à la cyclophiline du thymus de veau (3.8nm), en prenant comme référence le binding de la cyclosporine A. Les rapports  $IC_{50}/IC_{50CSA}$  sont rassemblés dans le tableau ci-après.

25

Dérivés	IIIb	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe	IVf	IVg	IVh
$IC_{50}/IC_{50CSA}$	3.2	6	5.8	5.3	7.8	15.4	4	24.1	21.5

La courbe d'inhibition de l'activité cis/trans isomérase de la cyclophiline A par le dérivé IVb est représentée à la figure 5.

De manière surprenante, malgré les modifications importantes, par exemple des modifications stériques ou la fixations de la configuration des liaisons peptidiques, qu'apporte l'introduction d'une pseudo-proline dans la partie peptidique des cyclosporines A ou C qui est réputée se lier à la cyclophiline, il n'a pas été constaté de pertes importantes d'activité pour la plupart des dérivés, en particulier pour les dérivés IIb, IVa-d et IVf. On note même que des dérivés tels que le dérivé IVb dont la pseudo-proline porte un substituant à caractère hautement hydrophobe, un biphenyl, inhibe relativement fortement la cyclophiline.

10

Comme on peut le voir, les dérivés de cyclosporine selon la présente invention possèdent des propriétés fort intéressantes.

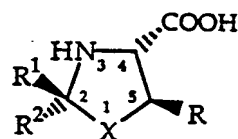
15 L'introduction d'un pseudo-proline portant des substituants appropriés permet en particulier l'un ou plusieurs des effets suivants:

- amélioration des propriétés pharmacocinétiques de cyclosporines par solubilisation dans un milieu physiologique;
- 20 - obtention de prémédicaments ou "prodrug" de cyclosporines
- introduction de groupes réactifs permettant des "crosslinkings" ou des marquages;
- modulation de la conformation peptidique des cyclosporines du fait des contraintes stériques dues au cycle à cinq chaînons ce qui
- 25 conduit à moduler l'activité biologiques des cyclosporines.

Revendications

1. Dérivé de cyclosporine dont l'enchaînement peptidique comprend au moins un résidu d'acide aminé non naturel de formule générale I suivante:

5



(I)

10

dans laquelle,

X représente un oxygène ou un soufre;

R représente un hydrogène ou un alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone;

15 R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent, indépendamment l'un de l'autre, un hydrogène, un alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, linéaire ou ramifié, substitué ou non, un alkylène ayant de 1 à 6 atomes de carbone, un aryle substitué ou non, un hétéro-aryle substitué ou non, un résidu d'un polymère hydrosoluble relié éventuellement à un groupe d'espacement.

20 2. Dérivé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'acide aminé de formule générale I, R représente un hydrogène ou un méthyle.

3. Dérivé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il dérive d'une cyclosporine dont l'enchaînement peptidique contient au moins l'un des acides aminés choisis parmi sérine, thréonine ou cystéine, sous une configuration d ou l.

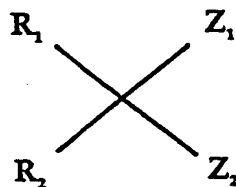
4. Dérivé selon la revendication 3, caractérisé en ce que au moins l'un quelconque des acides aminés sérine, thréonine ou cystéine de cyclosporine de référence est remplacé par l'acide aminé de formule générale I.

30



5. Procédé de préparation des dérivés selon la revendication 4, comprenant une réaction de N,O-acétalisation d'au moins un des trois acides aminés sérine, thréonine ou cystéine en mettant en contact la cyclosporine de référence avec un composé de formule II suivante:

5



(II)

10

dans laquelle

$Z_1$  et  $Z_2$  représentent, indépendamment l'un de l'autre, un halogène, un hydroxy, un alkoxy, un thiol; ou bien

$Z_1$  et  $Z_2$  représentent ensemble, un oxygène d'un carbonyle ou un soufre

15 d'une thione; et

$R_1$  et  $R_2$  ayant la même définition que donnée précédemment.



1/3

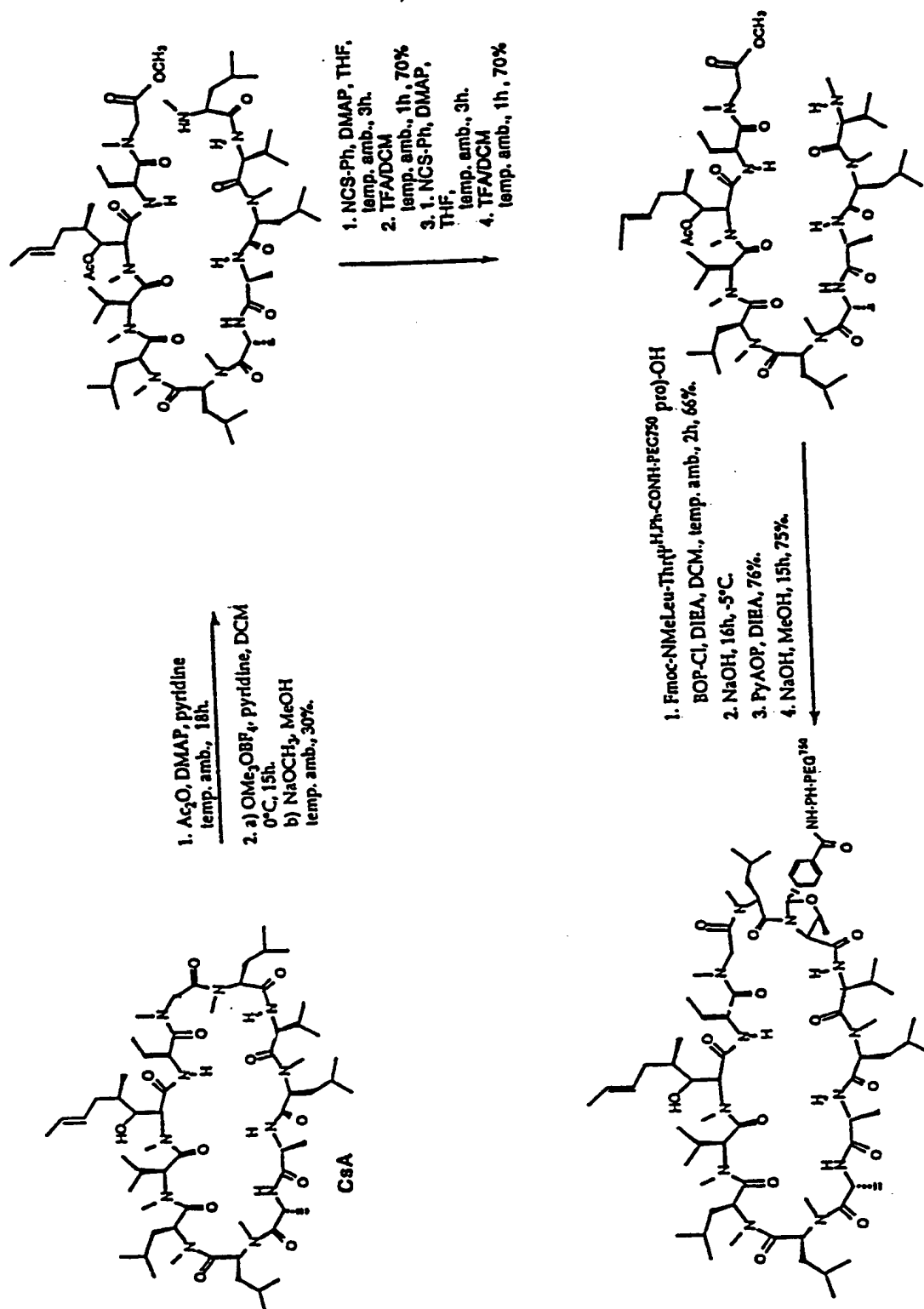


Fig. 1



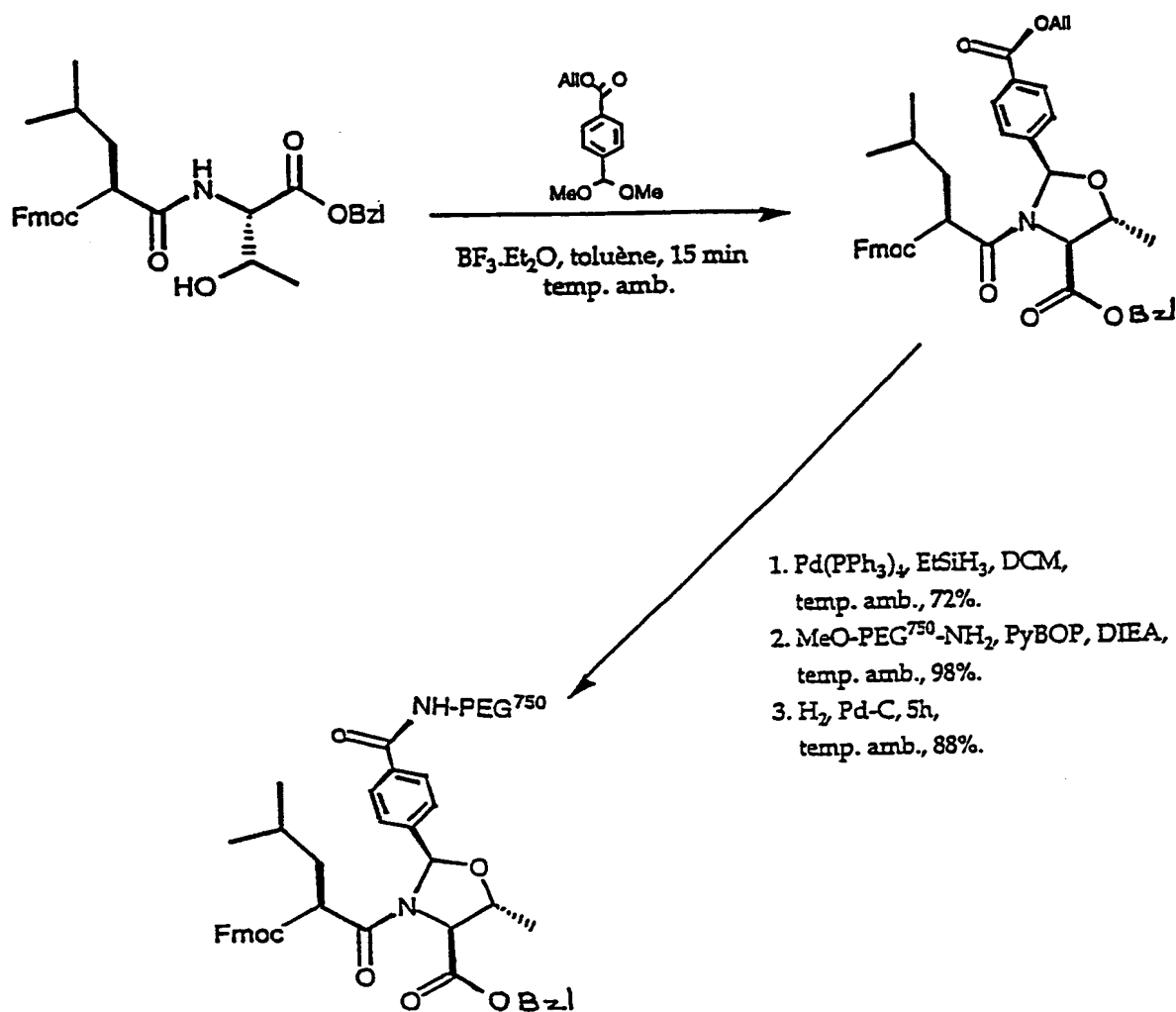


Fig. 2



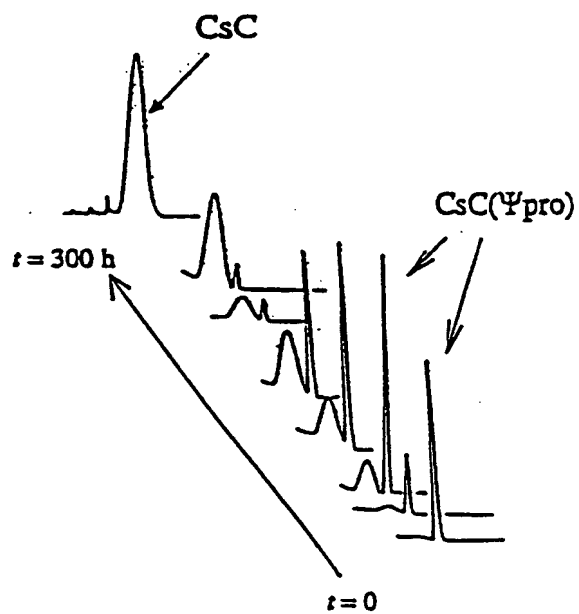


Fig. 3

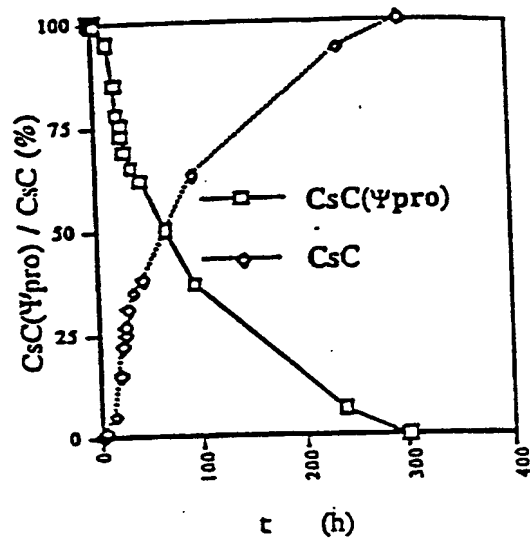


Fig. 4

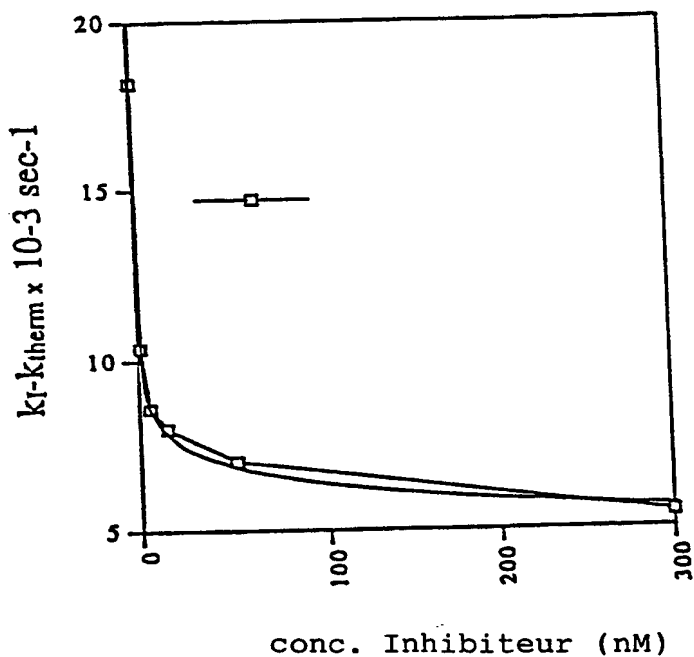


Fig. 5





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No

PCT/IB 00/00133

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07K7/64 A61K38/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 205 317 A (MERCK & CO INC) 7 December 1988 (1988-12-07) compound 15 on pages 15/53, claim 5 on page 48, line 28	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 95603, 5 January 1998 (1998-01-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 366197, KO SOO Y. AND WENGER ROLAND M.: "solide phase total synthesis of cyclosporin analogues" XP002133829 abstract	1-5
Y	& HELV.CHEM.ACTA, vol. 80, no. 3, 1997, pages 695-705, -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2000

Date of mailing of the international search report

25/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kronester-Frei, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Jonal Application No

PCT/IB 00/00133

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 300 785 A (NAT RES DEV) 25 January 1989 (1989-01-25) claims 3 and 8, examples 22, 23, 28, 29, 39, 40, 43, 52	1-5
A	EP 0 034 567 A (SANDOZ AG) 26 August 1981 (1981-08-26) example 7, claims	1-5
P,Y	WO 00 01715 A (DEBIOPHARM SA ;RUCKLE THOMAS (CH); MUTTER MANFRED (CH); WENGER ROL) 13 January 2000 (2000-01-13) claims	1-5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte. .onal Application No  
PCT/IB 00/00133

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2205317 A	07-12-1988	US 4798823 A US 4885276 A	17-01-1989 05-12-1989
EP 0300785 A	25-01-1989	AT 97916 T DE 3885959 D DE 3885959 T GB 2208294 A, B JP 1151600 A US 5079341 A	15-12-1993 13-01-1994 24-03-1994 22-03-1989 14-06-1989 07-01-1992
EP 0034567 A	26-08-1981	AT 10188 T AT 43335 T AT 28744 T AU 591455 B AU 4361085 A AU 6729181 A AU 548156 B EP 0098456 A EP 0098457 A IE 54936 B JP 1667321 C JP 3023560 B JP 56128725 A JP 1794247 C JP 2000137 A JP 4078629 B US 4396542 A US 4554351 A	15-11-1984 15-06-1989 15-08-1987 07-12-1989 14-11-1985 20-08-1981 28-11-1985 18-01-1984 18-01-1984 28-03-1990 29-05-1992 29-03-1991 08-10-1981 14-10-1993 05-01-1990 11-12-1992 02-08-1983 19-11-1985
WO 0001715 A	13-01-2000	NONE	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Je internationale No

PCT/IB 00/00133

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C07K7/64 A61K38/13

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GB 2 205 317 A (MERCK & CO INC) 7 décembre 1988 (1988-12-07) composé 15 sur pages 15/53, revendication 5 sur page 48, ligne 28	1-5
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 95603, 5 janvier 1998 (1998-01-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 366197, KO SOO Y. AND WENGER ROLAND M.: "solide phase total synthesis of cyclosporin analogues" XP002133829 abrégé	1-5
Y	& HELV.CHEM.ACTA, vol. 80, no. 3, 1997, pages 695-705, --- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kronester-Frei, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Je Internationale No

PCT/IB 00/00133

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 300 785 A (NAT RES DEV) 25 janvier 1989 (1989-01-25) revendications 3 et 8, exemples 22, 23, 28, 29, 39, 40, 43, 52	1-5
A	EP 0 034 567 A (SANDOZ AG) 26 août 1981 (1981-08-26) exemple 7, revendications	1-5
P, Y	WO 00 01715 A (DEBIOPHARM SA ; RUCKLE THOMAS (CH); MUTTER MANFRED (CH); WENGER ROL) 13 janvier 2000 (2000-01-13) revendications	1-5

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. .e Internationale No

PCT/IB 00/00133

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2205317 A	07-12-1988	US 4798823 A	17-01-1989
		US 4885276 A	05-12-1989
EP 0300785 A	25-01-1989	AT 97916 T	15-12-1993
		DE 3885959 D	13-01-1994
		DE 3885959 T	24-03-1994
		GB 2208294 A, B	22-03-1989
		JP 1151600 A	14-06-1989
		US 5079341 A	07-01-1992
EP 0034567 A	26-08-1981	AT 10188 T	15-11-1984
		AT 43335 T	15-06-1989
		AT 28744 T	15-08-1987
		AU 591455 B	07-12-1989
		AU 4361085 A	14-11-1985
		AU 6729181 A	20-08-1981
		AU 548156 B	28-11-1985
		EP 0098456 A	18-01-1984
		EP 0098457 A	18-01-1984
		IE 54936 B	28-03-1990
		JP 1667321 C	29-05-1992
		JP 3023560 B	29-03-1991
		JP 56128725 A	08-10-1981
		JP 1794247 C	14-10-1993
		JP 2000137 A	05-01-1990
		JP 4078629 B	11-12-1992
US 4396542 A	02-08-1983		
US 4554351 A	19-11-1985		
WO 0001715 A	13-01-2000	AUCUN	

